

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : 2 715 938
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : 94 01530

(51) Int Cl^e : C 12 N 7/01, C 07 H 21/00, C 12 Q 1/68, A 61 K 31/70,
38/16, C 07 K 14/15

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 04.02.94.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : Société Anonyme dite: BIO MERIEUX — FR.

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : 11.08.95 Bulletin 95/32.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : Se reporter à la fin du présent fascicule.

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(72) Inventeur(s) : Perron Hervé, Mallet François, Mandrand Bernard, Bedin Frédéric et Beseme Frédéric.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Cabinet Germain & Maureau.

(54) Constituants nucléiques du virus MSRV1, associé à la sclérose en plaques.

(57) L'invention concerne un virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, et associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce que son génome comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05 et leurs séquences complémentaires.

L'invention concerne en outre les constituants nucléiques desdits virus et leurs utilisations.

FR 2 715 938 - A1



**Constituants nucléiques du virus MSRV1,
associé à la sclérose en plaques**

La Sclérose en Plaques (SEP) est une maladie démyélinisante du système nerveux central (SNC) dont la 5 cause reste encore inconnue.

De nombreux travaux ont étayé l'hypothèse d'une étiologie virale de la maladie, mais aucun des virus connus testés ne s'est avéré être l'agent causal recherché: une revue des virus recherchés depuis des 10 années dans la SEP a été faite par E. Norrby (Prog. Med. Virol., 1978; 24, 1-39) et R.T. Johnson(dans "Handbook of clinical neurology, 47 Demyelinating diseases". Vinken P. et Bruyn G.W., eds. Amsterdam, Elsevier science Publishing, 1985, 319-336). Parallèlement, la possibilité 15 d'un facteur exogène et/ou infectieux est suggérée par l'existence d'épidémies localisées ou "clusters" de SEP comme ce qui a été observé dans les Iles Feroes entre 1943 et 1960 (Cook 1980), en Sardaigne (Rosati, 1988), en Norvège (Riisse, 1991), ainsi que par les études sur les 20 migrants (Elian, 1990). Parmi tous les facteurs exogènes suggérés, les virus ont été étudiés le plus souvent et une étiologie virale est classiquement évoquée.

L'observation, dans la SEP, de phénomènes assimilables à une réaction d'auto-immunité a conduit à 25 une hypothèse étiologique auto-immune "essentielle" (voir: Lisak R.P., Zweiman B. New Engl. J. Med. 1977; 297, 850-853, et, Lassmann H. et Wisniewski H.M. Arch. Neurol. 1979; 36, 490-497) . Cependant, cette auto-immunité dirigée contre certains composants du SNC s'est révélée 30 peu spécifique de la SEP et fréquente dans les inflammations du SNC, associées ou non à une infection, ainsi que cela a été montré par Hirayama M. et coll. (Neurology 1986; 36, 276-8), Kenneth G. Warren et coll. (Annals of Neurology 1986; 20, 20-25), Suzumura A. et 35 coll. (Journal of Neuroimmunology 1986; 11, 137-47), et, Tourtelotte W. et coll. (Journal of Neurochemistry 1986;

46, 1086-93). De plus, comme l'a fait remarquer E.J. Field (The Lancet 1989; I, 1272.) aucune des thérapeutiques immunosuppressives n'a permis d'obtenir des résultats décisifs contre la SEP. Il semble maintenant probable que 5 les manifestations "auto-immunes" sont induites par un mécanisme d'origine virale : co-sensibilisation à des déterminants vitaux associés à des molécules d'origine cellulaire, phénomènes de mimétisme moléculaire -comme cela a été décrit par Fujinami R.S et Oldstone M.B.A. 10 (dans "Molecular mimicry : Cross-reactivity between microbes and host proteins as a cause of autoimmunity". Oldstone M.B.A., ed.. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 145, Berlin, Springer-Verlag, 1989)- ou, selon P. Rudge (Journal of Neurology, Neurosurgery and 15 Psychiatry, 1991 54, 853-855), par expression de superantigènes rétroviraux .

Des travaux ont étayé une hypothèse selon laquelle un Rétrovirus serait à l'origine de la maladie : la découverte récente par A. Gessain et coll. (J. Infect. 20 Disease 1988; 1226-1234), de syndromes neurologiques associés au virus HTLV-I, connu à l'origine comme agent de leucémies T de l'adulte, a conduit de nombreux auteurs, tels que H. Koprowski et coll. (Nature 1985; 318, 154), M.Ohta et coll. (J. Immunol. 1986; 137, 3440), E. P. Reddy 25 et coll. (Science 1989; 243, 529), S.J. Greenberg et coll. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86, 2878), J.H. Richardson et coll. (Science 1989; 246, 821), S.L. Hauser et coll. (Nature 1986; 322, 176) et A. Karpas et coll. (Nature 1986; 322, 177), à rechercher une implication de 30 ce rétrovirus humain dans la SEP, cependant sans succès ou avec des résultats évoquant des réactions croisées.

Par ailleurs, il existe un modèle animal très proche de la SEP, induit par un rétrovirus : le virus MAEDI-VISNA du mouton. Il est connu que l'infection 35 naturelle par ce virus peut provoquer deux types de maladies chez cet animal: le Maedi, une pneumonie

interstitielle lymphocytaire qui peut survenir lors de la primo-infection par ce rétrovirus et une pathologie neurologique démyélinisante tardive suivant généralement une phase de latence prolongée, le Visna. La physiopathologie du Visna naturel concorde avec la plupart des données cliniques et biologiques de la SEP, comme le rapportent Johnson R.T. (Rev. Infect. Dis. 1985; 7, 66-67), Narayan O. et Cork L.C. (Rev. Infect. Dis. 1985; 7, 89-98), et Nathanson N. et coll. (Rev. Infect. Dis. 1985; 7, 75-82). L'infection expérimentale des moutons par inoculation intra-ventriculaire de souches neurovirulentes du virus VISNA a permis d'établir la responsabilité de ce virus dans la génèse de cette affection démyélinisante du mouton. Comme l'expliquent Nathanson N. et coll. (Rev. Infect. Dis. 1985; 7, 75-82), Hoffman P.M. et Panitch H.S. (dans, "Handbook of clinical neurology, 12 : Viral diseases" R.R. Mc Kendall, ed.. Elsevier science Publishing, Amsterdam, 1989, p 453-466), et A. Haase (Nature 1986; 322, 130-136), elle diffère de l'infection naturelle par ses conséquences neuropathologiques exacerbées, mais reste proche de la SEP. Il est de plus notable que, dans l'ensemble des travaux effectués sur ce sujet par les auteurs précités, notamment, le virus Visna est régulièrement retrouvé dans les cellules de plexus choroïdes du cerveau qui constituent un site de latence et de réPLICATION occasionnelle du provirus Visna; la localisation de ces cellules à l'interface sang/liquide céphalo-rachidien (LCR) explique certainement ce phénomène.

Récemment, un rétrovirus, différent des rétrovirus humains connus a été isolé chez des patients atteints de SEP par H. Perron et coll. (Res. Virol. 1989; 140, 551-561/ dans : "Current concepts in multiple sclerosis" Wiethölter et coll., eds. Amsterdam, Elsevier, 1991, p. 111-116 / The Lancet 1991; 337, 862-863). Les auteurs ont aussi pu montrer que ce rétrovirus pouvait être transmis *in vitro*, que des patients atteints de SEP produisaient

des anticorps susceptibles de reconnaître des protéines associées à l'infection des cellules leptoméningées par ce rétrovirus et que l'expression de ce dernier pouvait être fortement stimulée par les gènes immédiats-précoces de certains herpesvirus (Perron et coll. *Herpes simplex virus ICP0 and ICP4 immediate-early proteins strongly enhance expression of a retrovirus harboured by a leptomeningeal cell-line from multiple sclerosis.* 1993. *J. Gen. Virol.* 74; 65-72).

10 Tous ces résultats plaident en faveur du rôle dans la SEP d'au moins un rétrovirus inconnu ou d'un virus ayant une activité transcriptase inverse détectable selon la méthode publiée par H. Perron et coll. (*Res. Virol.* 1989; 140, 551-561) et qualifiée d'activité "RT de type 15 LM7".

Récemment, les travaux de la demanderesse ont permis d'obtenir deux lignées continues de cellules infectées par des isolats naturels provenant de deux patients différents atteints de SEP, par un procédé de culture tel que décrit dans la demande de brevet n° WO 93/20188. Ces deux lignées dérivées de cellules de plexus-choroïdes humains, dénommées LM7PC et PLI-2 ont été déposées à l'E.C.A.C.C. respectivement le 22 juillet 1992 et le 8 janvier 1993, sous les numéros 92072201 et 25 93010817, conformément aux dispositions du traité de Budapest. Par ailleurs, les isolats viraux possédant une activité RT de type LM7 ont également été déposés à l'E.C.A.C.C. sous la dénomination globale de "souches". La "souche" ou isolat hébergé par la lignée PLI-2, dénommée 30 POL-2, a été déposée le 22 juillet 1992 sous le n° V92072202. La "souche" ou isolat hébergé par la lignée LM7PC, dénommée MS7PG, et a été déposée le 8 janvier 1993 sous le n° V93010816.

A partir des cultures et des isolats précités, 35 caractérisés par des critères biologiques et morphologiques, on s'est ensuite attachés à caractériser

le matériel nucléique associé aux particules virales produites dans ces cultures.

Ainsi les objets de la présente invention sont les suivants:

- 5 - un virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, et associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce que son génome comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de 10 préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, décrites à la Fig 5, et leurs séquences complémentaires;
- 15 - un virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, et associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce que son génome code pour une séquence peptidique présentant au moins 50 %, et de 20 préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence peptidique codée par une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, et leurs séquences complémentaires;
- 25 - un fragment nucléotidique caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05 et leurs séquences complémentaires;
- 30 - undit fragment peut consister en une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05 et leurs séquences complémentaires;
- 35 - un ARN et/ou ADN et notamment vecteur de réPLICATION, comprenant un fragment de l'invention;

- une amorce spécifique pour l'amplification par polymérisation d'un ARN ou d'ADN caractérisé en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70% d'homologie avec au moins une partie d'un fragment de l'invention;
- une amorce a de préférence de 10 à 30 nucléotides;
- une sonde susceptible de s'hybrider spécifiquement avec un ARN ou d'un ADN d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisée ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec au moins une partie d'un fragment de l'invention;
- une sonde a de préférence au moins 10 nucléotides;
- une utilisation d'une sonde de l'invention ou d'une amorce de l'invention pour détecter et/ou identifier dans un échantillon biologique un virus associé à la sclérose en plaques;
- une composition thérapeutique antisens notamment pour le traitement de la sclérose en plaques, comprenant au moins une séquence nucléotidique selon de l'invention;
- un procédé pour détecter et/ou identifier un virus associé à la sclérose en plaques, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'on expose un ARN et/ou un ADN spécifique audit virus, ou leur ARN et/ou ADN complémentaire, à au moins une séquence nucléotidique selon de l'invention;
- ledit procédé comprend de préférence, avant d'exposer l'ARN et/ou l'ADN ou leur ADN et/ou ARN complémentaires, à la sonde, une étape d'hybridation dudit ARN et/ou dudit ADN avec au moins une amorce de l'invention et une étape d'amplification dudit ARN et/ou ADN;
- un procédé pour quantifier, dans un échantillon biologique, l'expression d'un virus associé à la sclérose

en plaques, caractérisé en ce qu'on expose un ARN et/ou un ADN spécifique audit virus, et/ou leur ADN et/ou ARN complémentaire, à au moins une sonde de l'invention;

5 - un peptide codé par la séquence nucléotidique du génome d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'il est codé par au moins une partie d'un fragment nucléotidique de l'invention;

- une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend un peptide de l'invention;

10 - un oligopeptide caractérisé en ce qu'il comprend au moins cinq aminoacides contigus du peptide de l'invention;

- une composition diagnostique, et/ou thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un peptide de l'invention, ou au moins une protéine de l'invention, ou au moins un oligopeptide de l'invention .

20 - une composition diagnostique, et/ou thérapeutique, et/ou prophylactique, comprenant un ligand spécifique à au moins un peptide, ou un oligopeptide, ou une protéine tels que définis précédemment.

Avant de détailler l'invention, différents termes utilisés dans la description et les revendications sont à présent définis :

25 - selon l'invention, un fragment nucléotidique ou un oligonucléotide est un enchaînement de monomères, caractérisé par la séquence informationnelle des acides nucléiques naturels, susceptibles de s'hybrider à un fragment nucléotidique dans des conditions prédéterminées,

30 l'enchaînement pouvant contenir des monomères de structures différentes et être obtenu à partir d'une molécule d'acide nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique,

35 - ainsi un monomère peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée;

dans l'ARN le sucre est le ribose, dans l'ADN le sucre est le désoxy-2-ribose; selon qu'il s'agisse de l'ADN ou l'ARN, la base azotée est choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine; ou un 5 nucléotide modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs; à titre d'exemple, la modification peut intervenir au niveau des bases, générant des bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5-10 désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine et toute autre base modifiée favorisant l'hybridation, au niveau du sucre à savoir le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide (P.E. Nielsen et al, Science, 254, 1497-1500 (1991)), au niveau du 15 groupement phosphate par exemple son remplacement par des esters notamment choisis parmi les esters de diphosphate, d'alkyl et arylphosphonate et de phosphorothioate,

- par "séquence informationnelle", on entend toute suite ordonnée de monomères, dont la nature chimique et 20 l'ordre dans un sens de référence constituent une information de même qualité que celle des acides nucléiques naturels,

- par hybridation, on entend le processus au cours duquel, dans des conditions appropriées, deux fragments 25 nucléotidiques, ayant des séquences suffisamment complémentaires, s'apparent pour former un double brin,

- une sonde est un fragment nucléotidique comprenant au moins 10 monomères, avantageusement de 10 à 50 monomères, possédant une spécificité d'hybridation dans 30 des conditions ; une sonde peut être utilisée à des fins de diagnostic telles que les sondes de capture et/ou de détection ou à des fins de thérapie,

- la sonde de capture peut être immobilisée sur un support solide par tout moyen approprié, c'est-à-dire 35 directement ou indirectement, par exemple par covalence ou adsorption passive,

- la sonde de détection est marquée au moyen d'un marqueur choisi parmi les isotopes radioactifs, des enzymes notamment choisis parmi la peroxydase et la phosphatase alcaline et ceux susceptibles d'hydrolyser un substrat chromogène, fluorogène ou luminescent, des composés chimiques chromophores, des composés chromogènes, fluorogènes ou luminescents, des analogues de bases nucléotidiques, et la biotine,

- les sondes utilisées à des fins de diagnostic de l'invention peuvent être mises en oeuvre dans toutes les techniques d'hybridation connues et notamment les techniques dites "DOT-BLOT" (MANIATIS et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982), "SOUTHERN BLOT" (SOUTHERN. E.M., J. Mol. Biol., 98, 503 (1975), "NORTHEN BLOT" qui est une technique identique à la technique "SOUTHERN BLOT" mais qui utilise de l'ARN comme cible, la technique SANDWICH (DUNN A.R., HASSEL J.A., Cell, 12, 23 (1977)); avantageusement, on utilise la technique SANDWICH dans la présente invention comprenant une sonde de capture spécifique et/ou une sonde de détection spécifique, étant entendu que la sonde de capture et la sonde de détection doivent présenter une séquence nucléotidique au moins partiellement différente,

- une autre application de l'invention est une sonde de thérapie, ladite sonde étant susceptible de s'hybrider *in vivo* sur l'ARN et/ou sur l'ADN pour bloquer les phénomènes de traduction et/ou de transcription,

- une amorce est une sonde comprenant de 10 à 30 monomères, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour l'initiation d'une polymérisation enzymatique par exemple dans une technique d'amplification telle que la PCR (Polymerase Chain Reaction), dans un procédé d'elongation, tel que le séquençage, dans une méthode de transcription inverse ou analogue,

- l'homologie caractérise le degré de similitude de deux fragments nucléotidiques comparés.

Etant donné qu'un virus possédant une activité enzymatique transcriptase inverse peut être génétiquement 5 caractérisé aussi bien sous forme d'ARN que d'ADN, il sera fait mention aussi de l'ADN que de l'ARN viral pour caractériser les séquences relatives à un virus possédant une telle activité transcriptase inverse.

10 L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée qui va suivre, faite en référence aux figures annexées dans lesquelles:

- la figure 1 représente des séquences des fragments de type MSRV-1B obtenus après PCR dans la région 15 "pol" définie par Shih et col.,

- la figure 2 représente l'arbre phylogénique des séquences de type MSRV-1B obtenues par PCR dans la région "pol" définie par Shih et col.,

- la figure 3, donne la définition d'une trame de 20 lecture fonctionnelle pour chaque famille de type MSRV-1B/"PCR pol",

- la figure 4 représente selon Fig 4A un alignement des protéiques déduites des consensus A,B,C,D de type MSRV-1B avec des séquences de rétrovirus connus, 25 selon Fig 4B l'arbre phylogénique, et selon Fig 4C l'homologie par rapport à ERV9,

- la figure 5, représente les consensus généraux en acides nucléiques des séquences MSRV-1B amplifiées par la technique PCR dans la région "pol" à partir d'ARN viral 30 issu des lignées LM7PC et PLI-2, identifiées sous les références SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03 et SEQ ID N04, et le consensus général avec amorce d'amplification référencée SEQ ID N05.

- la figure 6, est une représentation de l'activité 35 transcriptase inverse dans les fractions de saccharose prélevées sur un gradient de purification des virions

produits par les lymphocytes B en culture d'un patient atteint de SEP (l'activité transcriptase inverse (RT) est donnée en ordonnée en dpm (désintégrations par minute) et les numéros des fractions en abscisse),

5 - la figure 7, est une représentation de l'activité transcriptase inverse, comme dans la figure 6, mais à partir d'une culture de lymphocytes B d'un témoin exempt de SEP,

10 15 - la figure 8, illustre les séquences consensus et majoritaires de type MSRV-1B obtenues à partir des lymphocytes B d'un patient atteint de SEP selon Fig 8A, avec :

15 20 * MAJ correspondant à la séquence majoritaire dans laquelle les bases conservées dans tous les cas sont représentées par ATGC, les bases majoritaires sont représentées par atgc et les bases délétées par rapport au consensus sont représentées par -,

25 30 * VAR correspondant à la séquence majoritaire (variation) dans laquelle les bases conservées par rapport au consensus sont représentées par ., les bases minoritaires sont représentées par atgc et les bases délétées par rapport au consensus sont représentées par - et

35 * MIN correspondant aux séquences minoritaires (exception) dans lesquelles les bases conservées par rapport à la séquence majoritaire sont représentées par . et les bases délétées par rapport au consensus par -,

40 ainsi que la traduction de la séquence majoritaire, selon Fig 8B, dans laquelle la légende est la suivante :

an: acides nucléiques:

45 - en gras, caractères de petites tailles: les sites de restriction des amorces
 - en gras, caractères majuscules, extrémité 3' des amorces

- en souligné, la séquence nucléique majoritaire codante

prot: séquence protéique:

5 - en souligné: acides aminés codés par les amorces.

EXEMPLE 1: OBTENTION DE CLONES, DEFINISSANT UNE FAMILLE MSRV-1B, PAR AMPLIFICATION PCR "NICHEE" DES REGIONS POL CONSERVEES DES RETROVIRUS SUR DES PREPARATIONS 10 DE VIRIONS ISSUES DES LIGNEES LM7 ET PLI-2.

Une technique PCR dérivée de la technique publiée par Shih et coll. a été utilisée. Cette technique permet, par traitement de tous les composants du milieu réactionnel par la DNase, d'éliminer toute trace d'ADN contaminant. 15 Elle permet parallèlement, par l'utilisation d'amorces différentes mais chevauchantes dans deux séries successives de cycles d'amplifications PCR, d'augmenter les chances d'amplifier un ADNc résultant d'une quantité d'ARN faible au départ et encore réduite dans 20 l'échantillon par l'action parasite de la DNase sur l'ARN; ce, d'autant plus la DNase est utilisée dans des conditions d'activité en excès qui permettent d'éliminer toute trace d'ADN contaminant avant inactivation de cette enzyme restant dans l'échantillon par chauffage à 85°C 25 pendant 10 minutes. Cette variante de la technique PCR décrite par Shih et coll, a été utilisée sur des fractions de virions, purifiés comme précédemment pour les surnageants congelés des cultures LM7, issus cette fois de lignée lymphoblastoïde B spontanée provenant d'un nouveau 30 cas de SEP, de la culture PLI-2 (ECACC n° 92072201) et de la culture LM7PC (ECACC n°93010817), ces deux dernières cultures ayant été obtenues selon les méthodes ayant fait l'objet du brevet n° WO 93/20188.

Les produits issus de la PCR et de la RT-PCR ont été 35 purifiés après purification sur gel d'agarose selon les méthodes conventionnelles (Sambrook J., Fritsch E.F., et

Maniatis T., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press, 1989), puis resuspendu dans 10ml d'eau distillée. Une des propriétés de la polymérase Taq consistant à ajouter une adénine à 5 l'extrémité 3' de chacun des deux brins d'ADN, l'ADN obtenu a été directement inséré dans un plasmide à l'aide du kit TA Cloning™ (British Biotechnology). Les 2µl de solution d'ADN ont été mélangés avec 5µl d'eau distillée stérile, 1µl d'un tampon de ligation 10 fois concentré "10X 10 LIGATION BUFFER", 2µl de "pCRTM VECTOR" (25 ng/ml) et 1µl de "TA DNA LIGASE". Ce mélange a été incubé une nuit à 12°C. Les étapes suivantes ont été réalisées conformément au instructions du kit TA Cloning® (British Biotechnology). A la fin de la procédure, les colonies 15 blanches de bactéries recombinantes (white) ont été repiquées pour être cultivées et permettre l'extraction des plasmides incorporés selon la procédure dite de "miniprep" (Sambrook J., Fritsch E.F., et Maniatis T., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold spring harbor 20 laboratory press, 1989). La préparation de plasmide de chaque colonie recombinante a été coupée par une enzyme de restriction appropriée et analysée sur gel d'agarose. Les plasmides possédant un insert détecté sous lumière UV après marquage du gel au bromure d'éthidium, ont été 25 sélectionnés pour le séquençage de l'insert, après hybridation avec une amorce complémentaire du promoteur Sp6 présent sur le plasmide de clonage du TA Cloning Kit. La réaction préalable au séquençage a ensuite été effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation 30 du kit de séquençage "Prism ready reaction kit dye deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, ref. 401384) et le séquençage automatique a été réalisé avec l'appareil "automatic sequencer", modèle 373 A Applied Biosystems selon les instructions du fabricant.

35 Cette technique a d'abord été appliquée à deux fractions de virions purifiés comme décrit ci-après, sur

saccharose à partir de l'isolat "POL-2" produit par la lignée PLI-2 d'une part, et à partir de l'isolat MS7PG produit par la lignée LM7PC d'autre part: les surnageants de cultures sont collectés deux fois par semaine, pré-5 centrifugés à 10 000 tr/min pendant 30 minutes pour éliminer les débris cellulaires, et ensuite congelés à -80°C ou utilisés tels que pour les étapes suivantes. Les surnageants frais ou décongelés sont centrifugés sur un coussin de PBS-glycérol 30% à 100 000g (ou 30 000 tr/min 10 dans un rotor LKB-HITACHI de type 45 T) pendant 2h à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot sédimené est repris dans un petit volume de PBS et constitue la fraction de virions concentrés, mais non purifiés. Le virus concentré est ensuite déposé sur un gradient de 15 sucre dans un tampon PBS stérile (15 à 50% poids/poids) et ultracentrifugé à 35 000 tr/min (100 000g) pendant 12 h à +4°C dans un rotor à godets. 10 fractions sont recueillies et 20 μ l sont prélevés dans chaque fraction après homogénéisation pour y doser l'activité 20 transcriptase inverse selon la technique décrite par H. Perron et coll. (Res. Virol. 1989; 140, 551-561). Les fractions contenant le pic d'activité RT de type LM7 sont ensuite diluées dans du tampon PBS stérile et ultracentrifugées une heure à 35 000 tr/min (1000 000 g) 25 pour sédimenter les particules virales. Le culot de virions purifiés ainsi obtenu est alors repris dans un petit volume d'un tampon adéquat pour l'utilisation ultérieure qui en sera faite (Ex. Tampon Guanidium Thiocyanate pour l'extraction des ARN; PBS stérile pour le 30 stockage à -80°C).

Les séquences clonées et séquencées à partir de ces deux échantillons ont été analysées à l'aide du logiciel geneworks®, sur la dernière version (n° 79, 35 novembre 93) à ce jour de la banque de données genebank®. Elles correspondent à quatre catégories. Une première

catégorie de séquence (type 1), correspond à des séquences amplifiées à partir de matériel nucléique rétroviral contaminant la transcriptase inverse du MoMuLV utilisée pour l'étape de synthèse de l'ADN complémentaire, ainsi que cela a déjà été signalé précédemment. La deuxième catégorie (type 2), retrouvée dans la majorité des clones (55% des clones issus des isolats POL-2 des culture PLI-2, et, 67% des clones issus des isolats MS7PG des cultures LM7PC) correspond à une famille de séquences "pol" proches mais différentes du rétrovirus endogène humain dénommé ERV-9 ou HSERV-9.

La quatrième catégorie correspond à diverses séquences trouvées généralement en un exemplaire, ainsi qu'une de type rétroviral endogène, cependant jamais retrouvées par d'autres approches ou dans d'autres échantillons provenant de culture exprimant une activité transcriptase inverse de type LM7.

La deuxième catégorie de séquences représentant la majorité des clones est constituée de séquences dont la variabilité permet de définir quatre sous-familles de séquences. Ces sous-familles sont suffisamment proches entre elles pour qu'on puisse les considérer comme des quasi-espèces provenant d'un même rétrovirus, tel que cela est bien connu pour le rétrovirus HIV-1 par exemple (Meyerhans et al., Cell 1989; 58, 901-910), ou comme le résultat de l'expression de plusieurs provirus endogènes co-régulés dans les cellules productrices, puisqu'appartenant à la même famille de rétrovirus endogène et donc sensibles aux mêmes signaux de régulation générés éventuellement par le provirus réplicatif (Linial M.L. and Miller A.D. dans "Current topics in microbiology and immunobiology. Retroviruses, strategies of replication" vol. 157, p. 125-152; Swanstrom R. et Vogt P.K. éditeurs, Springer-Verlag, Heidelberg 1990). Cette nouvelle famille de rétrovirus endogènes ou, alternativement, cette nouvelle espèce

rétrovirale dont la génération de quasi-espèces a été obtenue en culture, et qui contient un consensus des séquences décrites à la suite est dénommée MSRV-1B.

5 Dans la figure 1 sont présentées les séquences des différents clones MSRV-1B séquencés lors de cette expérience. Ces séquences présentent une homologie en acides nucléiques allant de 70% à 88% avec la séquence HSERV9 référencée X57147 et M37638 dans la base de données
10 Genebank. L'arbre phylogénétique de ces séquences est présenté dans la figure 2. Dans cette figure, les sous-familles A, B, C D représentent les séquences qui ont été retrouvées de manière prépondérante dans des expériences similaires répétées ultérieurement, dans les échantillons
15 d'ARN pur de virions purifiés avec les isolats MS7PG et POL-2. A partir de ces familles de séquences, quatre séquences nucléiques "consensus" représentatives de différentes quasi-espèces d'un rétrovirus MSRV-1B éventuellement exogène ou de différentes sous-familles
20 d'un rétrovirus endogène MSRV-1B, ont été définies. Ces consensus représentatifs sont présentés dans la figure 3, avec la traduction en acides aminés. Une trame de lecture fonctionnelle existe pour chaque sous-famille de ces séquences MSRV-1B et l'on peut voir que la trame de
25 lecture ouverte fonctionnelle correspond à chaque fois à la séquence acides aminés venant en deuxième ligne sous la séquence acide nucléique. Un alignement des consensus A,B,C,D et d'un consensus général traduits en protéine avec les séquences de rétrovirus connus est présenté dans
30 la figure 4. Les consensus généraux en acides nucléiques des séquences MSRV-1B obtenues par cette technique PCR dans la région "pol" sont présentés dans la figure 5.

35 EXEMPLE 2: OBTENTION DE CLONES, DEFINISSANT UNE
FAMILLE MSRV-1B, PAR AMPLIFICATION PCR "NICHEE" DES

**REGIONS POL CONSERVEES DES RETROVIRUS SUR DES PREPARATIONS
DE LYMPHOCYTES B D'UN NOUVEAU CAS DE SEP.**

La même technique PCR modifiée d'après la
5 technique de Shih et coll. a été utilisée pour amplifier
et séquencer le matériel nucléique ARN présent dans une
fraction de virions purifiés au pic d'activité
transcriptase inverse "de type LM7" sur gradient de
saccharose, selon les protocoles décrits dans l'exemple 1,
10 à partir d'une lignée lymphoblastoïde spontanée, obtenue
par auto-immortalisation en culture de lymphocytes B d'un
patient SEP séropositif pour le virus d'Epstein-Barr (EBV)
après mise en culture des cellules lymphoïdes sanguine
dans un milieu de culture approprié contenant une
15 concentration appropriée de cyclosporine A. Une
représentation de l'activité transcriptase inverse dans
les fractions de saccharose prélevées sur un gradient de
purification des virions produits par cette lignée (Duc.)
est présentée dans la figure 6. De même, les surnageants
20 de culture d'une lignée B obtenue dans les mêmes
conditions à partir d'un témoin exempt de sclérose en
plaques ont été traités dans les mêmes conditions et le
dosage de l'activité transcriptase inverse dans les
fractions du gradient de saccharose s'est avéré négatif
25 partout (bruit de fond) et est présenté dans la figure 7.
La fraction 3 du gradient correspondant à la lignée B de
SEP et la même fraction sans activité transcriptase
inverse du gradient témoin non-SEP, ont été analysées par
la même technique RT-PCR que précédemment, dérivée de Shih
30 et coll., suivie des mêmes étapes de clonage et de
séquençage tels que décrites dans l'exemple 1.

L'analyse des clones recombinants prélevés au
hasard a fourni les mêmes quatres catégories de séquences
35 que précédemment. Les résultats sont présentés dans le
tableau annexé. Il est tout à fait notable que les

séquences de type MSRV-1B soient retrouvées dans le seul matériel associé à un pic d'activité transcriptase inverse "de type LM7" provenant de la lignée lymphoblastoïde B de SEP. Ces séquences n'ont pas été retrouvées avec le 5 matériel de la lignée lymphoblastoïde B témoin (non-SEP) dans 26 clones recombinants pris au hasard. Seules les séquences contaminantes de types Mo-MuLV et des séquences sans analogie rétrovirale particulière ont été retrouvées chez ce témoin. La différence de résultats est à 10 l'évidence hautement significative (chi-2, p<0,001). L'analyse des séquences de type MSRV-1B obtenues à partir de la lignée B de ce patient SEP est présentée dans la figure 8 .

TABLEAU

REPARTITION DES SEQUENCES OBTENUES PAR PCR
 MODIFIEE D'APRES SHIH ET COLL. A PARTIR DE CULTURE
 DE LYMPHOCYTES B D'UN PATIENT ATTEINT DE SCLEROSE
 EN PLAQUES VERSUS UN PATIENT CONTROLE

	TYPE 1	TYPE 2	TYPE 3 MSRV-2B	TYPE 4
Lympho B patient SEP	0 0 %	11 48 %	4 17 %	8 35 %
Lympho B patient non SEP	5 19 %	0 0 %	0 0 %	21 81 %



REVENDICATIONS

1/ Virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, et associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce que son génome comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05 et leurs séquences complémentaires.

2/ Virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, et associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce que son génome code pour une séquence peptidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence peptidique codée par une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04 SEQ ID N05 et leurs séquences complémentaires.

3/ Fragment nucléotidique caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05 et leurs séquences complémentaires.

4/ Fragment selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il consiste en une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05 et leurs séquences complémentaires.

5/ ARN et/ou ADN et notamment vecteur de réplication, comprenant un fragment selon la revendication 3 ou 4.

6/ Amorce spécifique pour l'amplification par polymérisation d'un ARN ou d'ADN, caractérisée en ce

qu'elle comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70% d'homologie avec au moins une partie d'un fragment selon la revendication 3 ou 4.

5 7/ Amorce selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle a de 10 à 30 nucléotides.

8/ Sonde susceptible de s'hybrider spécifiquement avec un ARN ou d'un ADN d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisée ce qu'elle comprend une séquence 10 nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec au moins une partie d'un fragment selon la revendication 3 ou 4.

9/ Sonde selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle a au moins 10 nucléotides.

15 10/ Utilisation d'une sonde selon la revendication 8 ou 9 ou d'une amorce selon la revendication 6 ou 7, pour détecter et/ou identifier dans un échantillon biologique un virus associé à la sclérose en plaques.

11/ Composition thérapeutique antisens notamment 20 pour le traitement de la sclérose en plaques, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence nucléotidique selon la revendication 8 ou 9.

12/ Procédé pour détecter et/ou identifier un virus associé à la sclérose en plaques, dans un 25 échantillon biologique, caractérisé en ce qu'on expose un ARN et/ou un ADN spécifique audit virus, ou leur ARN et/ou ADN complémentaire, à au moins une séquence nucléotidique selon la revendication 8 ou 9.

13/ Procédé selon la revendication 12, caractérisé 30 en ce que, avant d'exposer l'ARN et/ou l'ADN ou leur ADN et/ou ARN complémentaire, à la sonde, on hybride ledit ARN et/ou ledit ADN avec au moins une amorce selon la revendication 6 ou 7 et on amplifie ledit ARN et/ou ADN.

14/ Procédé pour quantifier, dans un échantillon 35 biologique, l'expression d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'on expose un ARN et/ou un

ADN spécifique audit virus, et/ou leur ADN et/ou ARN complémentaire, à au moins une sonde selon la revendication 8 ou 9.

15/ Peptide codé par la séquence nucléotidique du 5 génome d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'il est codé par au moins une partie d'un fragment nucléotidique selon la revendication 3 ou 4.

16/ Protéine caractérisée en ce qu'elle comprend un peptide selon la revendication 15.

10 17/ Oligopeptide caractérisé en ce qu'il comprend au moins cinq aminoacides contigus du peptide selon la revendication 15.

18/ Composition diagnostique, et/ou thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend 15 au moins un peptide selon la revendication 15, ou au moins une protéine selon la revendication 16, ou au moins un oligopeptide selon la revendication 17.

19/ Composition diagnostique, et/ou thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend 20 un ligand spécifique à au moins un peptide selon la revendication 15, ou à au moins une protéine selon la revendication 16, ou au moins un oligopeptide selon la revendication 17.

FIG 1

L	CG93	IC*	-CTTTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTCTTTGGT	CAGGTACTGG	CCAAAGACTT
L	CG95	IC*	-CTTTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTCTTTGGT	CAGGTACTGG	CCAAAGACTT
J	CG74	IC*	-CTTTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTCTTTGGT	CAGGTACTGG	CCAAAGACTT
I	CG139*	-	-CTTTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTCTTTGGT	CAGGTACTGG	CCAAAGACTT
E	CG134	IC*	-CTTTCAGG-	ATANCCCTCA	TCTCTTTGGT	CAGGTACTGG	CCAAAGACTT
D	CG32*	-	-CTTTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
H	CG106*	-	-CTTTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
B	CG10*	-	-CTTTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
D	CG25*	-	-CTTTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
D	CG30*	-	-CTTTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
B	CG20*	-	-CTTTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
B	CG12*	-	-CTTTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
E	CG39*	-	-CTTTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
R	CG14	IC*	-CTTCAAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
R	CG16	IC*	-CTTCAAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
R	CG 154*	-	-TTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
R	CG 156	IC*	-CTTCAAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
I	CG136*	-	-CTTCAAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
R	CG 159*	-	-CTTCAAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
R	CG158*	-	-CTTCAAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
R	CG163*	-	-TTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
R	CG 155*	-	-CTTCAAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
K	CG83*	-	-CTTCAAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
R	CG84	IC*	-CTTCAAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
K	CG85*	-	-CTTCAAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
D	CG28*	-	-CTTCAAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
L	CG91	IC*	-CTTCAAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
O	CG117*	-	-CTTCAAGA-	ATAGTCCTCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
O	CG 147*	-	-CTTCAAGA-	ATAGTCCTCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
O	CG 146	IC*	-CTTCAAGA-	ATAGTCCTCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
O	CG152	IC*	-CTTCAAGA-	ATAGTCCTCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
O	CG 149*	-	-CTTCAAGA-	ATAGTCCTCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
E	CG133*	-	-CTTCAAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
H	CG62*	-	-CTTCAAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
J	CG149*	-	-CTTCAAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
C	CG23*	-	-CTTCAAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
E	CG35*	-	-CTTCAAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
N	CG113*	-	-CTTCAAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
N	CG114	IC*	CGTTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
L	CG90	IC*	CGTTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
N	CG112*	-	CGTTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
N	CG109	IC*	CGTTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
C	CG129*	IC*	CGTTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
C	CG130*	-	CGTTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
J	CG141*	-	CGTTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CACCACTTGG	ATCAAACTT
I	CG68	IC*	-CGTTCAGG-	ATAGCCCCCA	TCTATTTGGC	CGGGCAATAA	CGGGCACTT

L	CG93	IC*	AGGCCAATTC	TCATACCTGG	GCACCTCTGT	CTTCTAG-
L	CG95	IC*	AGGCCAATTC	TCATACCTGG	GCACCTCTGT	CTTCTAG-
J	CG74	IC*	AGGCCAATTC	TCATACCTGG	GCACCTCTGT	CTTCTAG-
I	CG139*		AGGCCAATTC	TCATACCTGG	GCACCTCTGT	CTTCTAG-
E	CG134	IC*	AGGCCAATTC	TCATACCTGG	GCACCTCTGT	CTTCTAG-
D	CG32*		GAGTCATTC	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
M	CG106*		GAGTCATTC	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
B	CG10*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
D	CG25*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
D	CG30*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
C	CG20*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
B	CG12*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
E	CG39*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
B	CG14	IC*	GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
B	CG16	IC*	GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
R	CG 154*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
R	CG156	IC*	GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
I	CG136*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
R	CG 159*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
R	CG158*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
R	CG163*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
R	CG 155*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
K	CG83*		GAGTCATTC	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
K	CG84	IC*	GAGTCATTC	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
K	CG85*		GAGTCATTC	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
D	CG28*		GAGTCATTC	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
L	CG91	IC*	GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
O	CG117*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
O	CG 147*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
Q	CG 146	IC*	GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
Q	CG152	IC*	GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
Q	CG 149*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
E	CG133*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
H	CG62*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
J	CG149*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
C	CG23*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
E	CG35*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
N	CG113*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
N	CG114	IC*	GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
L	CG90	IC*	GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
H	CG112*		GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
N	CG109	IC*	GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
E	CG129*	IC	GAGCCAGTT	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
C	CG130*		AACCCGTTTC	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
J	CG141*		AACCCGTTTC	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-
I	CG68	IC*	AACCCGTTTC	TCATACCTGG	ACACTCTCTGT	CTTCTAG-

FIG 2

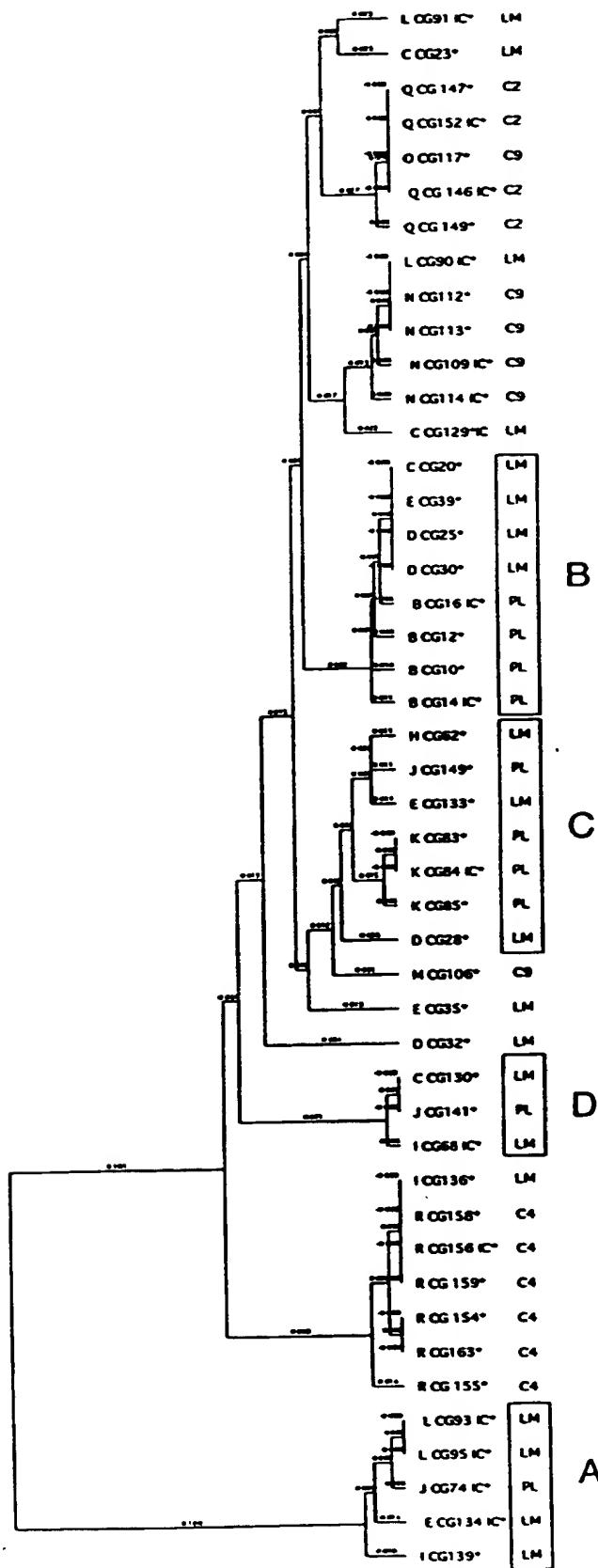


FIG 3

CONSENSUS A

GTTTAGGGATAGCCC TCATCTCTTGGTCA GGTACTGGCCAAGA TCTAGGCCACTTCTC 60
 V . G . P S S L W S G T G P R S R P L L
 F R D S P H L F G Q V L A Q D L G H F S
 L G I A L I S L V R Y W P K I . A T S Q

 AGGTCCAGGCACCTCT GTTCCTTCAG 85
 R S R H S V P S
 G P G T L F L Q
 V Q A L C S F

CONSENSUS B

GTTCAGGGATAGCCC CCATCTATTGGCCA GGCACTAGCTCAATA CTTGAGCCAGTTCTC 60
 V Q G . P P S I W P G T S S I L E P V L
 F R D S P H L F G Q A L A Q Y L S Q F S
 S G I A P I Y L A R H . L N T . A S S H

 ATACCTGGACACTCT TGTCCCTCGGT 86
 I P G H S C P S
 Y L D T L V L R
 T W T L L S F G

CONSENSUS C

GTTCAGGGATAGCCC CCATCTATTGGCCA GGCATTAGCCAAGA CTTGAGTCAATTCTC 60
 V Q G . P P S I W P G I S P R L E S I L
 F R D S P H L F G Q A L A Q D L S Q F S
 S G I A P I Y L A R H . P K T . V N S H

 ATACCTGGACACTCT TGTCCCTTCAG 85
 I P G H S C P S
 Y L D T L V L Q
 T W T L L S F

CONSENSUS D

GTTCAGGGATAGCTC CCATCTATTGGCCT GGCATTAACCGAGA CTTAAGCCAGTTCTC 60
 V Q G . L P S I W P G I N P R L K P V L
 F R D S S H L F G L A L T R D L S Q F S
 S G I A P I Y L A W H . P E T . A S S H

 ATACGTGGACACTCT TGTCCCTTGG 85
 I R G H S C P L
 Y V D T L V L W
 T W T L L S F

FIG 4A

Consensus	...SP.LFQ. ...A..L...R ...P.....	30
HIV1 QG/YM	WKGSPAIFQS SMTKILEPFR KQNPDIVYQ	30
HIV2 QG/YM	WKGSPAIFQH TMRQVLEPFR KANKDVIIQ	30
VISNA QG/YM	WKLSPAVYQF TMQKILRGWI EEHPMIQLGI	30
CAEV QG/YM	WKLSPSVYQF TMQEILEDWI QHQPEIQLGI	30
MMTV QG/YM	MKNSPTLQK FVDKAILTVR DKYQDSYIVH	30
HERVK QG/YM	MLNSPTICQT FVGRALQPVR EKFSDCYIIH	30
JSRV QG/YM	MTNSPTLCQK FVATAIAAPVR QRFPQLYLVH	30
MPMV QG/YM	MANSPTLCQK YVATAIHKVR HAWKQMYIIH	30
HTLV1 QG/YM	FKNSPTLFEM QLAHILQPIR QAFPQCTILQ	30
HTLV2 QG/YM	FKNSPTLFEQ QLAAVLNPMR KMFPPTSTIVQ	30
Trad cons30 B	FRDSPHLFGQ ALAQYLSQF- -SYLDTLVLR	28
Trad cons33/28 C	FRDSPHLFGQ ALAQDLSQF- -SYLDTLVQ	28
Trad cons24 D	FRDSSHLFGL ALIIRDLSQF- -SYVDILVW	28
ERV9 QG/YM	FRDSPHLFGQ ALAKDLGHF- -SSPGTLVQ	28
Trad cons37 A	FRDSPHLFGQ VLAQDLGHF- -SGPGTLFLQ	28

FIG 4B

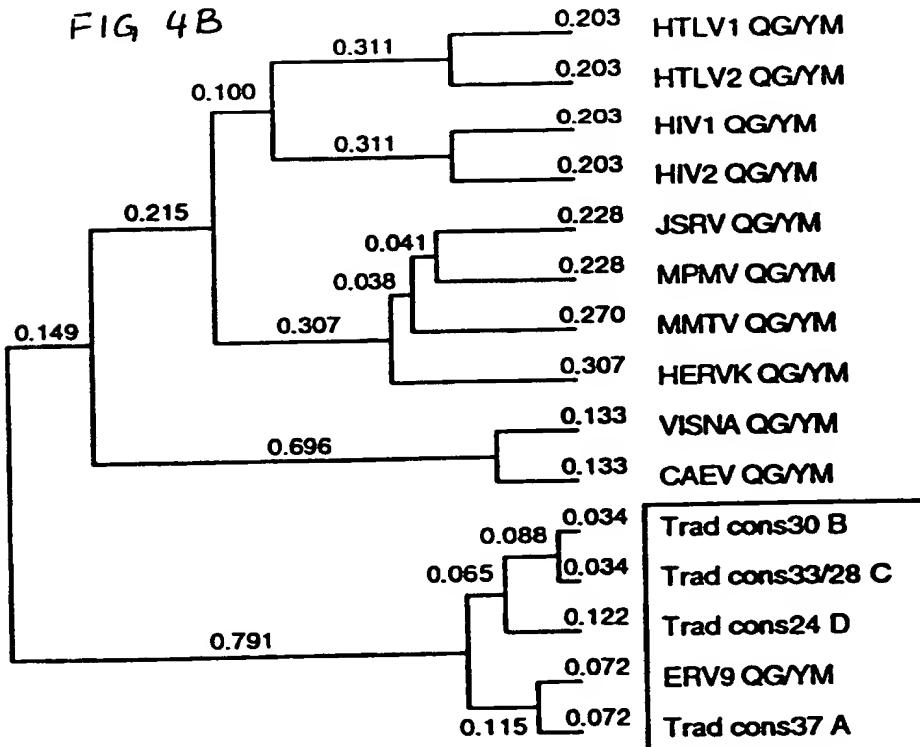


FIG 4C

		Taille	% d'homologie
Consensus	FRDSPHLFGQ ALAQDLSQFS Y.DTLVQ	28	
Trad cons30 B Y..... L.....R	28	71%
Trad cons33/28 C L.....	28	79%
Trad cons24 DS....L ..TR..... V.....W	28	64%
ERV9 QG/YM K..GH.. SPG.....	28	100%
Trad cons37 A V..... GH.. GPG..F..	28	86%

FIG 5

CONSENSUS A

Consensus	GTTCAGGGAT ANCCCTCATIC TCTTGGTCA GGTACTGGCC CAAGATCTAG	50
Consensus	GCCACTTCTC AGGTOCAGSN ACICIGTYCC TTCAG	85

(SEQ ID NO 1)

CONSENSUS B

Consensus	GTTCAGGGAT AGC0000CATIC TATTGGCCA GGCACTAGCT CAATACTTGA	50
Consensus	GCCAGTTCTC ATACCTGGAC AYTCTGYCC TTGGT	86

(SEQ ID NO 2)

CONSENSUS C

Consensus	GTTCARRGAT AGC0000CATIC TATTGGG0W RGYATTAGCC CAAGACTTGA	50
Consensus	GYCAATTCTC ATACCTGGAC ACTCTIGYCC TTYRG	85

(SEQ ID NO 3)

CONSENSUS D

Consensus	GTTCAGGGAT AGCTOCCCATIC TATTGGG0T GGCATTAAACC CGAGACTTAA	50
Consensus	GCCAGTTCTC ATACGTGGAC ACTCTIGYCC TTGG	85

(SEQ ID NO 4)

CONSENSUS GENERAL MSRV-1B AVEC AMORCES D'AMPLIFICATION

Consensus	GIGTIGCCAC AGGGGTTTAR RGATANCYCY CATCIMTTG GY0RGYAYT
Consensus	RRCYCRAKAY YTRRGYCAVT TCTYAKRYSY RGSNAYTCIB KYCCTTYRGT
Consensus	ACATGGATGA C

(SEQ ID NO 5)

FIG 6

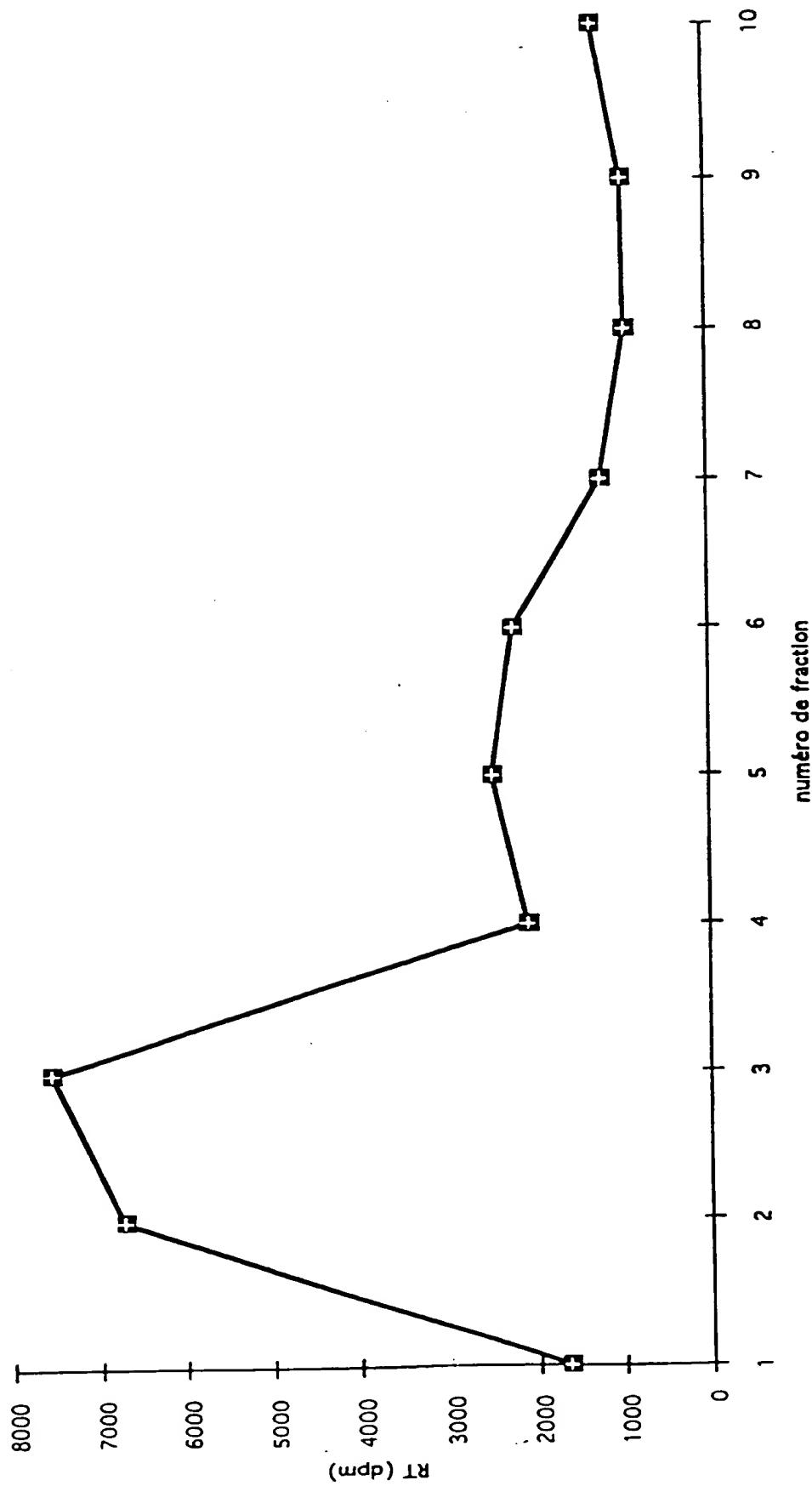


FIG 7

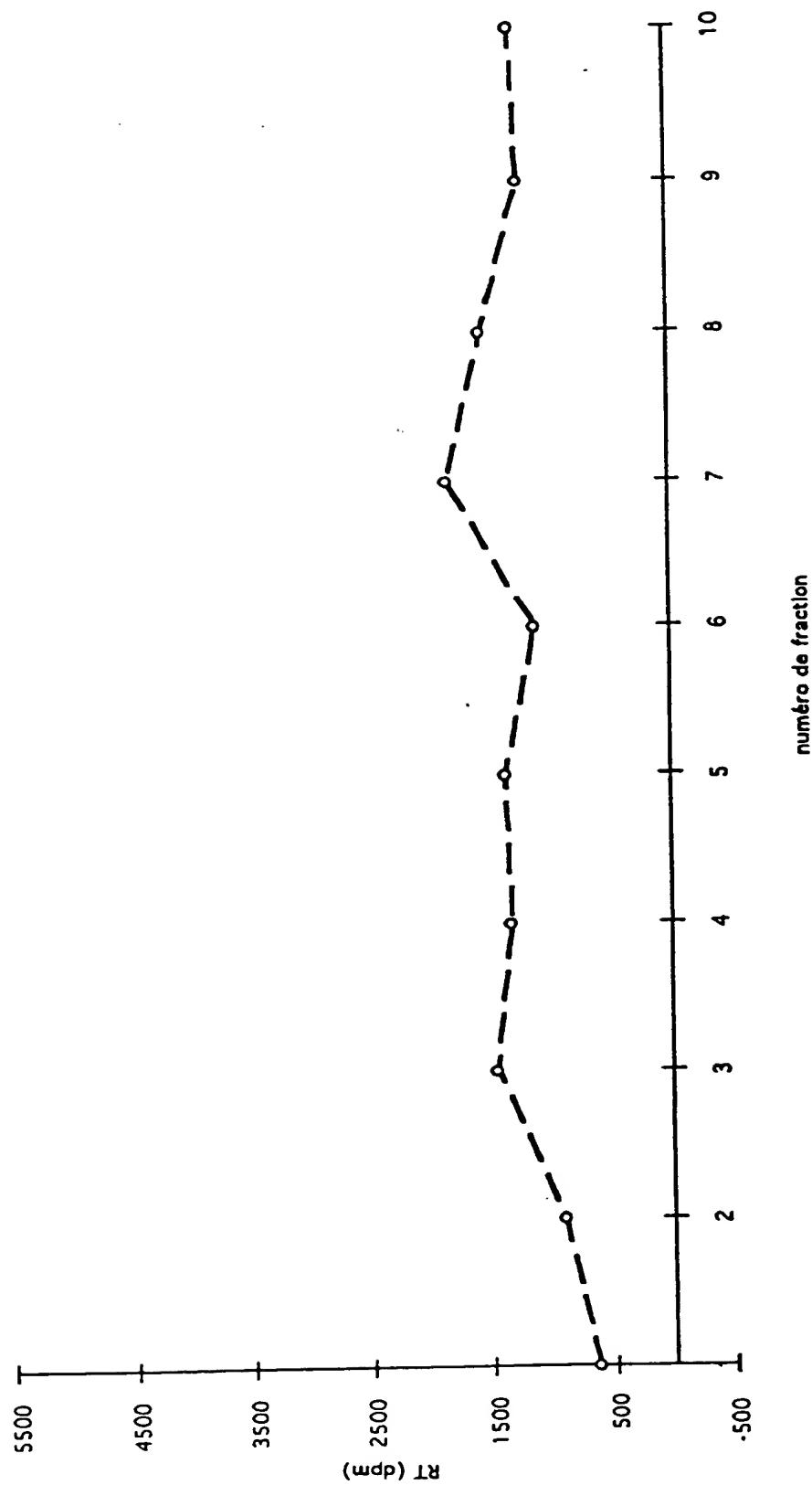


FIG 8A

Consensus	CTTGGATCCA QNGYTVMCMC ARGGGNNCAG CGNRTANNCC CCNTCINTYW	50
MAJ	CTTGGATCCA GtGtTgcCaC AgGGGtTCAG GG-aTAGcCC CCaTCTaTtt	50
VARc.aa.c. .a...c.C. . .gg...a.ca	50
Consensus	GGMCAGGSTA TTAGYCCAAG ACTTGA ₉ CCA GNNCTCATAAC CTGGAACACT	100
MAJ	GGcCAGGc-A TTAGcCCAAG ACTTGA ₉ CCA Gt _t CTCATAAC CTGGA-CACT	100
VAR	..a....gt.t.....a....	98
Consensus	CTTGCNCCTT CGGNACGRKG GNATGACMN CTGANGCTTG AGA	143
MAJ	CTTGC-TCTT CGGTAC-atG G-ATGACcTg CTGAaGCTTG AG-	141
VARc----gggG .c....a.c CTGANGCTTG AG-	137
MIN-----	125

FIG 8B

an	CTTGGATCCA <u>GTGTTGCCAC AGGGGTTCA</u> G GATAGCCCC CATCTATTG	50
prot	<u>V L P O G F R D S P H L F G</u>	
an	<u>GCCAGCCATT AGOCCAAGAC TTGAGCCAGT TCCTACACCT GGACACTCTT</u>	100
prot	Q A L A Q D L S Q F S Y L D T L	
an	<u>GTCCTTCGGT ACATGGATGA CCTGCTGAAG CTTGAG</u>	137
prot	V L R Y M D D	

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,A	WO-A-93 20188 (BIO MERIEUX) * le document en entier * ---	1,2
A	AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol.8, no.5, Mai 1992 page 922 H. PERRON ET AL 'Retrovirus isolation from patients with multiple sclerosis: epiphénomène ou facteur causal ?' * abrégé * ---	1-19
D,A	LANCET THE, vol.337, no.8745, 6 Avril 1991, LONDON GB pages 862 - 863 H. PERRON ET AL 'Isolation of retrovirus from patients with Multiple Sclerosis' * le document en entier * ---	1,2
A	RESEARCH IN VIROLOGY, vol.143, no.5, 1992 pages 337 - 350 H. PERRON ET AL 'In vitro transmission and antigenicity of a Retrovirus isolated from a Multiple Sclerosis patient' * le document en entier * ---	1,2
D,A	JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol.74, 1993 pages 65 - 72 H. PERRON ET AL 'Herpes Simplex Virus ICP0 and ICP4 immediate early proteins strongly enhance expression of a retrovirus harboured by a leptomeningeal cell line from a patient with Multiple Sclerosis' * le document en entier * --- -/-	1,2

2

THE MUSICAL

Date d'achèvement de la recherche

200

7 Octobre 1994

Le Cornec, N

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

X : particulièrement pertinent à lui seul
 Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
 A : pertinent à l'encontre d'un ou de plusieurs revendications ou arrière-plans technologique général
 O : divulgation non-écrite
 P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
 E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure
 à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date
 de dépôt ou qu'à une date postérieure.
 D : cité dans la demande
 L : cité pour d'autres raisons

 & : membre de la même famille, document correspondant

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHEES (Int.C.I.S.)
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	WO-A-93 07259 (SCLEROSE-FORENINGEN (THE DANISH MS-SOCIETY)) * le document en entier * ---	1-19	
D,A	CURRENT CONCEPTS IN MULTIPLE SCLEROSIS, 1991, AMSTERDAM, ELSEVIER pages 11 - 116 H. PERRON ET AL 'Isolations of an unknown retrovirus from CSF, blood, and brain cells of patients with multiple sclerosis' * le document en entier * -----	1,2	
2			
	Date d'achèvement de la recherche 7 Octobre 1994	Rechercheur Le Cornec, N	
	CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'en moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non décrite P : document intercalaire	T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	